

# 土贝母皂苷甲作用线粒体途径促进 人绒毛膜癌 Bewo 细胞凋亡

黄 霏<sup>1</sup> 于 超<sup>2</sup> 刘洪涛<sup>2</sup> 杨 竹<sup>2</sup> 丁裕斌<sup>1</sup> 王应雄<sup>1,2</sup> 何俊琳<sup>1\*</sup>

(重庆医科大学, <sup>1</sup> 公共卫生学院生殖生物学研究室, <sup>2</sup> 生命科学研究院, 重庆 400016)

**摘要** 为了研究土贝母皂苷甲(TBMS1)诱导人绒毛膜癌 Bewo 细胞凋亡的作用及机制, 分别采用 MTT 法检测细胞增殖的抑制作用, 流式细胞术测定药物对细胞周期、凋亡及线粒体跨膜电位( $\Delta\Psi_m$ )的影响, DNA 琼脂糖凝胶电泳分析 DNA 含量变化和 DNA 断裂的情况, 蛋白质免疫印迹法及 RT-PCR 法检测细胞凋亡相关基因表达的变化。研究结果显示, TBMS1 呈浓度依赖性显著抑制 Bewo 细胞的生长; 流式细胞术分析显示 TBMS1 能促进细胞凋亡, 将细胞周期阻滞在 G<sub>1</sub> 期, 并导致线粒体跨膜电位降低, 细胞色素 c (Cyt c) 释放, caspase-3 表达增强; DNA 梯状区带验证了药物诱导细胞凋亡的发生; Bax 表达上调, Bcl-2 及磷酸化的 p38 表达下调等结果表明, TBMS1 可能是通过 p38/MAPK 信号通路调控作用, 导致线粒体功能紊乱, 从而影响凋亡相关基因表达, 有效诱导 Bewo 细胞凋亡。

**关键词** 土贝母皂苷甲; 细胞凋亡; 线粒体; Bewo 细胞

绒毛膜癌是一种发生于胎盘外层的绒毛膜上皮细胞(即滋养叶细胞)的高度恶性肿瘤, 药物治疗效果不佳。从天然植物中寻找毒副作用小, 安全有效的药物是抗肿瘤研究的热点<sup>[1]</sup>。土贝母 *Bolbostemma paniculatum* (Maxim) Franquet 为葫芦科植物, 具有清热解毒、消肿散结之功效。主要分布于河北、河南、山西、山东、甘肃等省<sup>[2]</sup>。其化学成分在抗癌、抗病毒、抗炎、免疫抑制、杀精子等方面已有报道<sup>[3]</sup>。土贝母皂苷甲(TBMS1)被证明是土贝母的主要抗癌成分<sup>[4]</sup>, 具有诱导肿瘤细胞分化<sup>[5]</sup>、周期阻滞和促进凋亡<sup>[6,9]</sup>作用, 其作用位点可能是微管和线粒体<sup>[7,8]</sup>。但 TBMS1 对绒毛膜癌的作用与机制研究还未见报道。因此, 本文以不同浓度 TBMS1 作用于绒毛膜癌 Bewo 细胞, 探讨其对细胞凋亡作用的影响及可能机制, 为肿瘤治疗的实验研究和临床应用提供参考数据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 主要试剂与药品 DMEM/F12 培养基(美国 HyClone 公司), 胎牛血清(杭州四季清公司), 胰蛋白酶(美国 Gibco 公司), MTT(噻唑蓝)试剂、罗丹明 123 (rhodamine-123)染色剂(美国 Sigma 公司), FITC-Annexin V/PI 双染试剂盒(南京凯基公司), 鼠抗人

p38、细胞色素 c (Cyt c) 单克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司), Trizol (大连 TaKaRa 公司), 逆转录 cDNA 试剂盒及 RT-PCR 试剂盒(杭州 Bioer 公司), Tris 饱和酚(北京 Tiangen 公司), 其他试剂均为国产分析纯。土贝母皂苷由重庆医科大学生命科学研究院自备。

1.1.2 细胞培养 人绒毛膜癌 Bewo 细胞(中国协和医科大学细胞库提供), 以含 10% 灭活胎牛血清、100 U/ml 青霉素、100 mg/L 链霉素的 DMEM/F12 培养基, 在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养。0.125% 胰蛋白酶-0.02% EDTA 消化细胞, 2~3 天传代一次, 取对数生长期细胞进行实验。

### 1.2 方法

1.2.1 MTT 法分析细胞活力 取对数生长期 Bewo 细胞, 以  $5 \times 10^4$  个/ml 接种于 96 孔细胞培养板, 培养 12 h 后, 改用加不同浓度的 TBMS1 (4.0、8.0、16.0  $\mu\text{mol/L}$ ) 的培养液(对照组仅加入相同体积的培养液), 作用 24 h。每孔加入 20  $\mu\text{l}$  5 mg/ml MTT, 继续 37 °C 培养 3 h。每孔再加入 100  $\mu\text{l}$  DMSO 溶液, 振荡 10 min, 用酶标仪在 492 nm 波长处测吸光值(A)。实验重复 3 次。按下列公式计算细胞活力值及细胞生长抑制率, 并计算 IC<sub>50</sub> 值:

收稿日期: 2009-07-23 接受日期: 2009-11-24  
教育部博士点基金(No.20070631007)和重庆医科大学重点基金(No. XBZD.200806)资助项目

\* 通讯作者。Tel: 023-68485001, E-mail: hejunlin\_11@yahoo.com.cn

细胞活力值=(实验组平均A值/对照组平均A值)  
×100%

细胞生长抑制率=(1-实验组平均A值/对照组  
平均A值)×100%

**1.2.2 流式细胞仪分析 TBMS1 对细胞周期和细胞凋亡的影响** 培养细胞经不同浓度 TBMS1(4.0、8.0、16.0 μmol/L)处理 24 h 后,收集细胞,用 70% 的冰乙醇固定 24 h 以上。上机前过 40 目网,加碘化丙啶(PI)及 RNA 酶,37 °C 避光染色 20 min。用流式细胞仪(FACSVantage SE,美国 BD 公司)测定细胞周期。

细胞培养及药物处理同前,收集的细胞加入 5 μl 标记有异硫氰酸荧光素(FTTC)的膜联蛋白 V(annexin V),然后加入 2 μl PI,混匀置 37 °C 水浴暗处温育 15 min,加入 400 μl 缓冲液,用流式细胞仪测定细胞凋亡。

**1.2.3 DNA laddering 试验** 细胞培养及药物处理同前,离心收集细胞,加入 0.8 ml Tris 饱和酚(pH 值大于 7.5,内含 0.25% 8-羟基喹啉和 0.1% β-巯基乙醇),振荡 10 min,4 °C 12 000 r/min 离心 5 min。吸上清液,按 2:1 加入无水乙醇沉淀 DNA,4 °C 14 000 r/min 离心 10 min。弃上清液,加入 0.1 ml 无菌水溶解,1.5% 琼脂糖凝胶电泳,成像。

**1.2.4 流式细胞仪检测线粒体跨膜电位(ΔΨm)** 细胞培养及药物处理同前,用 1 ml 含 1.3 nmol/L 罗丹明 123 的培养基重悬收集的细胞,37 °C 避光静置 30 min,PBS 洗涤 2 次后,流式细胞仪检测。

**1.2.5 Western 印迹检测 p38 和 Cyt c** 收集前述办法处理的细胞,加入 200 μl 细胞裂解液(含 10% Ser/Thr 抑制剂,10% Tyr 抑制剂,10% PMSF)。冰上放置 15 min。4 °C 12 000 r/min 离心 15 min。取上清液,按 4:1 加入 5× 蛋白质上样缓冲液,沸水变性 5 min,经 12% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后,电转移到 PVDF 膜上,经 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h 后,用鼠抗人磷酸化 p38 (1:300)、总 p38 (1:100)、β-肌动蛋白(1:300)单克隆抗体于 4 °C 温育过夜。再与结合有辣根过氧化物酶的抗鼠抗体(1:2 500)室温温育 1 h。PBS 洗涤 3 次,每次 5 min。ECL 法显影。

Cyt c 的提取参照文献<sup>[9]</sup>方法,收集细胞(10<sup>8</sup> 个/ml),并于预冷的 400 μl 匀浆缓冲液重悬,移入玻璃匀浆器内于冰浴中匀浆 5 min,匀浆液于 4 °C,1 000 g 离心 10 min,共两次,取上清液于 4 °C,12 000 g 离心 15 min,收集上清液即为不含细胞核和线粒体的胞浆成分,沉淀部分即为含线粒体蛋白部分;采用 Bradford 法测定样品的蛋白质含量。取 20 μl 稀释好的样品

进行电泳(SDS-PAGE),转膜后室温下封闭 1 h,加入 Cyt c 单克隆抗体(sc-13156),1:500 稀释,4 °C 温育过夜,其后步骤同前。

**1.2.6 RT-PCR 检测凋亡相关基因** 细胞培养及药物处理同前,用 Trizol 试剂进行细胞总 RNA 的抽提;逆转录反应合成 cDNA,反应条件:42 °C 1 h,95 °C 5 min;RT-PCR 扩增 *Bcl-2*、*Bax* 基因产物,反应条件:94 °C 预变性 4 min 后,*Bcl-2*:94 °C 变性 1 min,53 °C 退火 45 s,72 °C 延伸 50 s,循环 35 次;*Bax*:94 °C 变性 1 min,52 °C 退火 45 s,72 °C 延伸 1 min,循环 30 次;*Caspase-3*:94 °C 变性 45 s,56 °C 退火 45 s,72 °C 延伸 50 s,循环 30 次;*GAPDH*:94 °C 变性 30 s,54 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s,循环 30 次。引物:*Bcl-2*:上游:5'-GAA GGA ATG TTG CAT GAG TCG GAT C-3',下游:5'-AAG GGA ACT GCG GAT GTA AAG ATC C-3',产物 200 bp;*Bax*:上游:5'-TTT TGC TTC AGG GTT TCA TC-3',下游:5'-GTT CTT CGA CTC GCT CAC AG-3',产物 146 bp;*Caspase-3*:上游:5'-GTG GAA TTG ATG CGT GAT G-3',下游:5'-GGA ATC TGT TTC TTT GCA TG -3',产物 500 bp;*GAPDH*:上游:5'-GTG GAA TCA TAT TGG AAC ATG T-3',下游:5'-CTC TCT GCT CCT CCT GTT CGA CAG-3',产物 230 bp。扩增产物 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像仪(GelDoc2000,美国 Bio-Red 公司)成像。

**1.2.7 统计学处理** 数据用均数±标准差表示,两组间比较采用 *t* 检验分析,以 *P*<0.05 为差异有显著性。

## 2 结果

### 2.1 TBMS1 对 Bewo 细胞活力的影响

为了确定药物的细胞毒性,首先分析其对细胞活力的影响,结果显示:不同浓度 TBMS1 (4.0、8.0、16.0 μmol/L)作用 24 h,细胞平均活力值分别为 91.57%、65.60%、38.69% (图 1),与对照组比较明显抑制 Bewo 的生长(*P*<0.05)。IC<sub>50</sub> 值为 11.8 μmol/L。

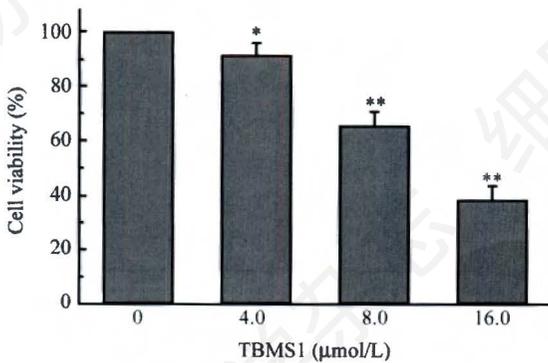
### 2.2 流式细胞仪测定 TBMS1 对 Bewo 细胞周期和凋亡的影响

TBMS1 对 Bewo 细胞周期和凋亡的影响分析显示:与对照组比较,不同浓度 TBMS1 (4.0、8.0、16.0 μmol/L)处理细胞 24 h 后,细胞凋亡数逐渐增加(*P*<0.05),坏死细胞数也同步递增(数据未显示)。说明 TBMS1 可以促进细胞凋亡(图 2)。TBMS1 对细胞周期影响,主要阻滞细胞于 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期(图 3,表 1)。

### 2.3 TBMS1 对肿瘤细胞 DNA 的损伤作用

实验结果显示对照组 DNA 主要集中在 1 000~

2 000 bp 的大片段, 当 TBMS1 作用 24 h 后, DNA 发生断裂, 出现大小不等的 DNA 片段, 用 16.0  $\mu\text{mol/L}$



**Fig.1** Cell growth inhibition of TBMS1

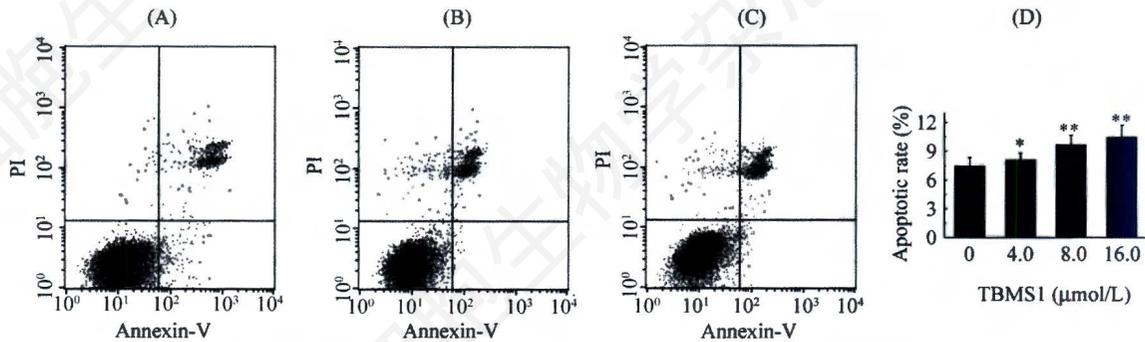
\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , compared with control.

TBMS1 作用细胞后, 100~200 bp DNA 片段含量增加, DNA 电泳条带更加弥散, 表明 DNA 损伤程度加剧(图 4), 提示 TBMS1 导致细胞内 DNA 损伤可能是促进细胞凋亡的因素之一。

#### 2.4 TBMS1 对线粒体跨膜电位( $\Delta\Psi_m$ )的影响

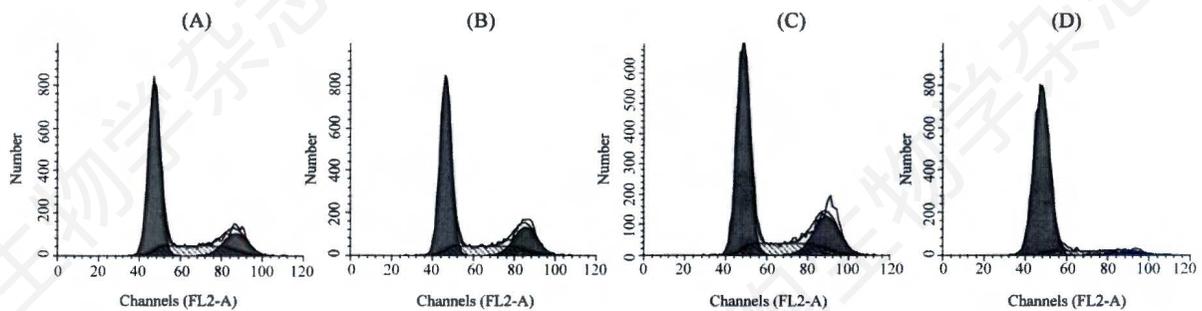
线粒体跨膜电位( $\Delta\Psi_m$ )可以反映线粒体功能状态, 当其发生功能紊乱时会导致细胞凋亡。为了分析 TBMS1 对线粒体的作用, 采用罗丹明 123 作为指示剂, 通过流式细胞仪检测荧光强度, 结果显示: 不同浓度的药物(4.0、8.0、16.0  $\mu\text{mol/L}$ )作用细胞 24 h 后, 线粒体跨膜电位增高(图 5), 膜透性改变, 导致线粒体功能紊乱。表明 TBMS1 可能通过影响线粒体功能促进细胞凋亡的发生。

#### 2.5 TBMS1 促进线粒体 Cyt c 释放并增加 caspase-



**Fig.2** Effect of TBMS1 on Bewo cells apoptosis at different concentration

A: control; B: 4.0  $\mu\text{mol/L}$  TBMS1; C: 8.0  $\mu\text{mol/L}$  TBMS1; D: quantify analysis of apoptotic rate. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , compared with control.



**Fig.3** Effect of TBMS1 on Bewo cell cycle at different concentration

A: control; B: 4.0  $\mu\text{mol/L}$  TBMS1; C: 8.0  $\mu\text{mol/L}$  TBMS1; D: 16.0  $\mu\text{mol/L}$  TBMS1.

**Table 1** Effect of TBMS1 on Bewo cell cycle and apoptosis (AP) at different concentration

Group	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	S	G <sub>2</sub> /M	AP
Control	63.78±2.31	19.79±2.60	16.42±3.08	7.47%
4 $\mu\text{mol}$ TBMS1	62.34±3.10	19.40±2.45	18.26±1.79	8.10%*
8 $\mu\text{mol}$ TBMS1	60.99±1.85*	21.52±2.77	17.49±2.75*	9.70%**
16 $\mu\text{mol}$ TBMS1	88.49±3.01**	2.96±2.53**	8.55±1.97**	10.50%**

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , compared with control.

### 3 表达

以 16.0 μmol/L TBMS1 作用 Bewo 细胞不同时间, 发现 4 h 后即可在细胞浆中检测到 Cyt c 的释放, 作用 24 h 达到较高水平(图 6A)。而高、低不同浓度 TBMS1 作用 24 h 对细胞中 Caspase-3 mRNA 表达的影响, 与对照组比较明显有促进作用(图 6B)。

### 2.6 TBMS1 对凋亡相关基因表达及 p38 磷酸化的影响

不同浓度 TBMS1 (4.0、8.0、16.0 μmol/L) 处理细胞 24 h 后, 对凋亡相关基因表达的影响结果显

示: 与对照组相比, *Bcl-2* 的表达下调, 而促凋亡基因 *Bax* 的表达则上调(图 7A、图 7B); Western 印迹结

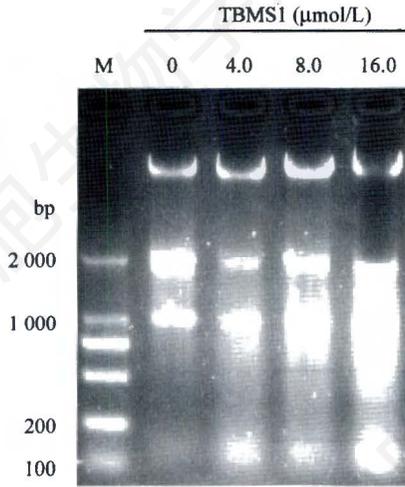


Fig.4 DNA agarose gel electrophoresis

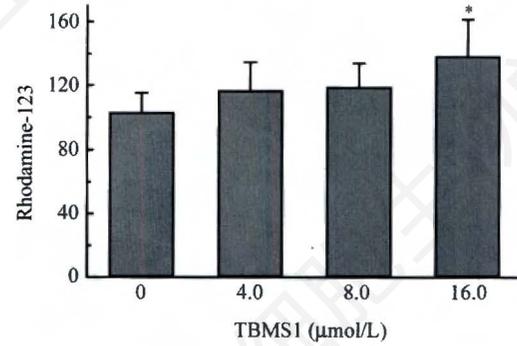


Fig. 5 Depletion of mitochondrial transmembrane potential ( $\Delta\Psi_m$ )

\* $P < 0.05$ , compared with control.

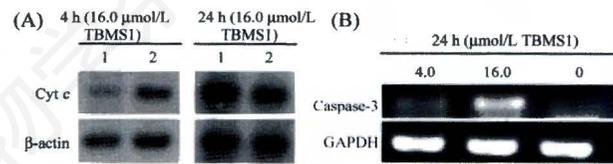


Fig.6 Effect of TBMS1 on release of Cyt c and expression of caspase-3

A: TBMS1 promote release of Cyt c from mitochondria. 1: protein in cytoplasm; 2: protein in mitochondria. B: TBMS1 enhance expression of caspase-3 mRNA in dose-dependant manner.

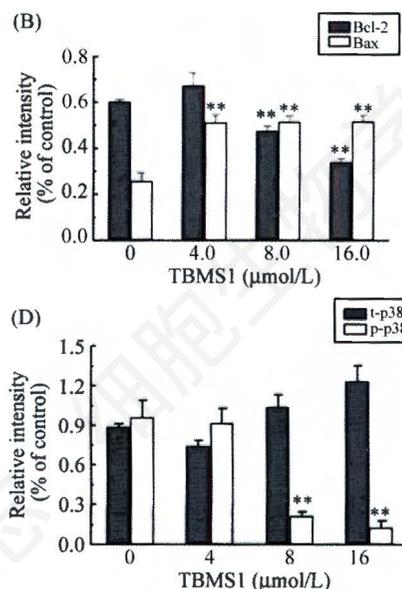
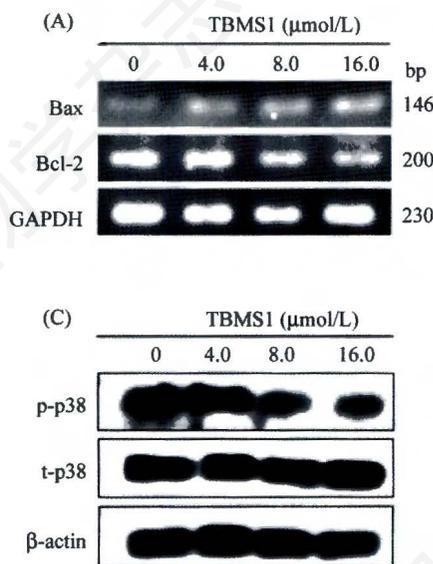


Fig.7 Effect of TBMS1 on apoptosis-related genes

A: effect of TBMS1 on *Bax* and *Bcl-2* mRNA; B: quantify analysis of mRNA expression; C: effect of TBMS1 on phosphorylated p38; D: quantify analysis of protein expression. \*\* $P < 0.01$ , compared with control.

果显示: 与对照组相比, p38 磷酸化被抑制(图 7C、图 7D), 说明 TBMS1 促进绒毛膜癌细胞发生凋亡原因之一, 可能是通过调节 p38/MAPK 信号通路影响凋亡相关基因表达。

### 3 讨论

土贝母皂苷在抗癌、抗炎和抗病毒等方面具有较明确的药理作用, 但在抗肿瘤机制方面的研究还不够深入。本研究首先通过 MTT 法发现 TBMS1 对人绒毛膜癌 Bewo 细胞的生长呈浓度依赖性抑制作用, 确定实验药物浓度的应用范围。由于药物抗肿瘤作用的强弱与它们诱导肿瘤细胞凋亡的活性呈正比<sup>[10]</sup>, 因此采用流式细胞术分析检测证明了 TBMS1 是通过诱导 Bewo 细胞凋亡发挥作用的。进一步研究发现 TBMS1 作用 Bewo 细胞 24 h 后, DNA 发生断裂, 造成细胞内 DNA 含量减少出现亚倍体峰, 细胞被阻滞于 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期。G<sub>1</sub> 期末是细胞周期运行的关键时期, 亦是药物等因素作用的敏感点<sup>[11]</sup>, 土贝母皂苷抑制细胞周期可能是药物作用的位点之一。

细胞凋亡发生的原因和途径是复杂多样的, 许多基因参与调控细胞的凋亡。Bcl-2 作为抗凋亡基因与促凋亡基因 Bax<sup>[12]</sup> 结合成异构二聚体存在于细胞中, Bax 表达水平增加可拮抗 Bcl-2 的作用, 并促进细胞凋亡<sup>[13]</sup>。已有研究发现活化 p38/MAPK 信号通路通过作用 Bcl-2, 使异构二聚体解聚, Bax 由胞浆移位并插入到线粒体膜中, 形成 Bax 通道, 促进 Cyt c 释放入胞质, 使前 caspase 剪切成有促细胞凋亡活性的 caspase-3<sup>[14,15]</sup>。因此, 线粒体在细胞凋亡的调控中起重要作用。本研究证实了这一途径: TBMS1 通过抑制 p38 信号通路, 作用于 Bcl-2/Bax 二聚体, 从而影响线粒体功能, 特别是促使线粒体跨膜电位( $\Delta\Psi_m$ ) 明显改变, 释放 Cyt c, 触发 caspase 联级从而诱导细胞凋亡。TBMS1 对绒毛膜癌 Bewo 细胞的作用机制可能是多条通路发生交互作用, 共同发挥抑制肿瘤的

效应, 其相关机制尚有待进一步深入探索。

### 参考文献(References)

- [1] 邹夏慧, 张焜和. 中药抗肿瘤作用的分子机制研究进展, *国外医学中医中药分册*, 2004, 26(6): 330-334
- [2] 朱海鸣, 朱晓薇, 侯文彬, 等. 中药土贝母的现代研究进展, *时珍国医国药*, 2008, 19(12): 2985-2987
- [3] Yu LJ, Ma RD, Yu T. Induction of morphological and functional differentiation of human promyelocytic leukemia cells (HL-60) by tubeimoside I, *Planta Med*, 1996, 62(2): 119-121
- [4] Xu Y, Chiu JF, He QY, et al. Tubeimoside-1 exerts cytotoxicity in HeLa cells through mitochondrial dysfunction and endoplasmic reticulum stress pathways, *J Proteome Res*, 2009, 8(3): 1585-1593
- [5] 胡章, 马润娣, 于立坚. 土贝母皂苷甲对人 HL-60 髓性白血病细胞周期与凋亡的影响, *中国肿瘤临床*, 2003, 30(3): 163-171
- [6] 翁昔阳, 马润娣, 于立坚. 土贝母皂苷甲诱导人鼻咽癌细胞 CNE-2Z 凋亡, *癌症*, 2003, 22(8): 806-811
- [7] 宋刚, 马润娣, 于立坚. 土贝母皂苷对人低分化上皮样鼻咽癌细胞(CNE-2Z)微管的作用, *中国临床药理学与治疗学*, 2005, 10(6): 617-621
- [8] Wang F, Ma RD, Yu LJ. Role of mitochondria and mitochondrial cytochrome c in tubeimoside I-mediated apoptosis of human cervical carcinoma HeLa cell line, *Cancer Chemother Pharmacol*, 2006, 57(3): 389-399
- [9] Yang J, Liu X, Bhalla K, et al. Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked, *Science*, 1997, 275(5303): 1129-1132
- [10] 李林, 夏丽娟, 蒋超, 等. 三尖杉酯碱和高三尖杉酯碱诱导人早幼粒白血病细胞的程序性死亡, *药学报*, 1994, 29(91): 667-672
- [11] Bartek J, Lukas J. Mammalian G<sub>1</sub>- and S-phase checkpoints in response to DNA damage, *Curr Opin Cell Biol*, 2001, 13(6): 738-741
- [12] Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival, *Science*, 1998, 281(5381): 1322-1326
- [13] 石熠慧, 汤雪明. 细胞凋亡信号的传递途径及其调控, *细胞生物学杂志*, 1999, 21(2): 49-53
- [14] De Chiara G, Marcocci ME, Torcia M, et al. Bcl-2 phosphorylation by p38 MAPK: identification of target sites and biologic consequences, *J Biol Chem*, 2006, 281(30): 21353-21361
- [15] Nicholson DW, Thornberry NA. Apoptosis: life and death decisions, *Science*, 2003, 299(5604): 214-215

## Effect of Tubeimoside I in Inducing Apoptosis of Human Choriocarcinoma Bewo Cells through Mitochondrial Pathway

Pei Huang<sup>1</sup>, Chao Yu<sup>2</sup>, Hong-Tao Liu<sup>2</sup>, Zhu Yang<sup>2</sup>, Yu-Bin Ding<sup>1</sup>, Ying-Xiong Wang<sup>1,2</sup>, Jun-Lin He<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>Laboratory of Reproductive Biology, School of Public Health, <sup>2</sup>Institute of Life Science, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

**Abstract** To investigate the effect of tubeimoside 1 (TBMS1) on apoptosis of human choriocarcinoma Bewo cells. Inhibitory effect of TBMS1 on cell proliferation was measured by MTT assay. Induction of cell cycle arrest, apoptosis and depletion of mitochondrial transmembrane potential ( $\Delta\Psi_m$ ) were determined by flow cytometry and gel electrophoresis of fragmented DNA. Apoptosis-related genes were detected by Western blot and RT-PCR analysis. The results showed that TBMS1 displayed strong inhibition of Bewo cell growth in a dose-dependent manner. In addition, TBMS1 treatment for 24 h led cell to marked apoptosis, significant arrest in phase G<sub>1</sub> of cell cycle and statistical decrease in  $\Delta\Psi_m$ . It was revealed that cytochrome *c* was released from mitochondria and caspase-3 expression was enhanced. Typical ladder bands were also observed in Bewo cells after TBMS1 exposure. Further, Western blot analysis revealed that TBMS1 caused up-regulation of *Bax* expression, down-regulation of *Bcl-2* expression, and inhibition of phosphorylated p38 production. In conclusion, our findings suggest that TBMS1 can effectively induce choriocarcinoma cell apoptosis, which is, at least partly, regulated by suppression of mitochondrial dysfunction and phosphorylated p38 activation.

**Key words** tubeimoside 1; apoptosis; mitochondria; Bewo cells

Received: July 23, 2009 Accepted: November 24, 2009

This work was supported by the Foundation for Doctoral Program of Ministry of Education (No.20070631007) and the Foundation of the Key Project of Chongqing Medical University (No.XBZD.200806)

\*Corresponding author. Tel: 86-23-68485001, E-mail: hejunlin\_11@yahoo.com.cn